

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

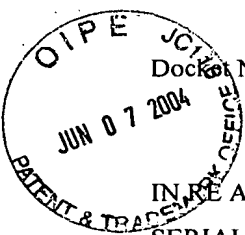
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Docket No. 246312US0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Tadayuki IWASE, et al.

GAU: 1651

SERIAL NO: 10/729,961

EXAMINER:

FILED: December 9, 2003

FOR: PRIMERS FOR DETECTING FUSOBACTERIUM NUCLEATUM BY PCR METHODS AND METHODS FOR DETECTION

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:


<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2002-358698	December 10, 2002
Japan	2003-403715	December 2, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon



Vincent K. Shier, Ph.D.
Registration No. 50,552

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 日
Date of Application:

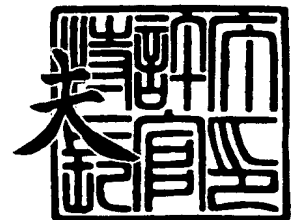
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 0 3 7 1 5
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 4 0 3 7 1 5]

出 願 人 花王株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



【書類名】 特許願
【整理番号】 030847
【提出日】 平成15年12月 2日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内
 【氏名】 岩瀬 忠行
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内
 【氏名】 板野 守秀
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内
 【氏名】 矢納 義高
【特許出願人】
 【識別番号】 000000918
 【氏名又は名称】 花王株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100104499
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岸本 達人
 【電話番号】 03-5524-2323
【選任した代理人】
 【識別番号】 100101203
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山下 昭彦
 【電話番号】 03-5524-2323
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108800
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 星野 哲郎
 【電話番号】 03-5524-2323
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2002-358698
 【出願日】 平成15年12月10日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 131935
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0209535

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

下記 (1) 及び (2) のプライマーを含む、PCR 法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出及び/又は定量用の方法。

(1) 配列番号 1 に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するフォワードプライマー

(2) 配列番号 2 に記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するリバースプライマー

【請求項 2】

下記プライマー (A) とプライマー (B) とを含む PCR 法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマーセット。

(A) 配列番号 3 に記載の塩基番号第 1 番目乃至第 39 番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(B) 配列番号 3 に記載の塩基番号第 863 番目乃至 883 番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するプライマー

【請求項 3】

下記プライマー (C) と請求項 2 に記載のプライマー (B) とを含む PCR 法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマーセット。

(C) 配列番号 3 に記載の塩基番号第 1 番目乃至第 18 番目の塩基配列

【請求項 4】

請求項 2 又は 3 に記載のプライマーセットを用い、フゾバクテリウム・ニュークレタムのリボゾーマル DNA を鋳型とした PCR 法により得られた、フゾバクテリウム・ニュークレタム菌に特異的な遺伝子増幅産物。

【請求項 5】

標識物質によって標識されたプローブである、請求項 4 に記載の遺伝子増幅産物。

【請求項 6】

前記標識物質が、ビオチン、ジゴキシゲニン、FITC、アクリジン、ジニトロフェニル、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ及び $[^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 5 に記載の遺伝子増幅産物。

【請求項 7】

請求項 2 に記載のプライマー (A) と (B) とを含むプライマーセットを用いて PCR を行う第 1 ステップと、

前記第 1 ステップによって増幅された産物を鋳型として用い、請求項 2 に記載のプライマー (A)、及び、下記プライマー (D) 又は (E)、を含むプライマーセットを用いて PCR を行う第 2 ステップと、
を含むフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

(D) 配列番号 3 に記載の塩基番号第 124 番目乃至 156 番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(E) 配列番号 3 に記載の塩基番号第 124 番目乃至 143 番目の塩基配列の相補的塩基配列

【請求項 8】

配列番号 4 に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上のプライマーと請求項 2 に記載のプライマー (B) とを含むプライマーセットを用いて PCR を行う第 1 ステップと、

前記第 1 ステップによって増幅された産物を鋳型として用い、請求項 2 に記載のプライマー (A) および請求項 7 に記載のプライマー (D) を含むプライマーセットを用いて PCR を行う第 2 ステップと、
を含むフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

【請求項 9】

請求項 2 に記載のプライマー（A）と請求項 7 に記載のプライマー（D）又は（E）を用い、配列番号 5 の塩基配列を含む DNA を鋳型とした PCR 法により得られた、フゾバクテリウム・ニュークレタム菌に特異的な遺伝子増幅産物。

【請求項 1 0】

配列番号 5 の塩基配列からなるプローブ。

【書類名】明細書

【発明の名称】PCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマー及びその検出方法

【技術分野】**【0001】**

本発明は、歯肉縁上歯垢や歯肉縁下歯垢、舌苔、唾液、歯肉溝滲出液、血液、髄液、化膿部位やその他組織等の生体試料中から化膿性疾患関連細菌及び口臭原因菌であるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌を特異的に検出する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

従来、細菌の同定は培養法を用いて行うことが一般的であり、増殖培養、分離培養等を行ってシングルコロニーを生育させる必要があるため、数日から数週間を要していた。さらにその後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色等による細胞染色、およびプロピオン酸産生試験、糖資化性等多くの生化学的性状を調べる必要があり、培養法による細菌の同定には、設備、時間、費用を要した。

【0003】

前記培養法の欠点を克服する方法として、近年、PCR法による細菌同定が行われるようになった。PCR法を用いることにより細菌同定は迅速かつ鋭敏に行えるようになったが、PCR法はプライマーが不可欠であり、目的とする細菌を検出・同定できるかはプライマー設計にかかっていた。

【0004】

一方、ヒト口腔から分離されるフゾバクテリウム属として、フゾバクテリウム・ナヴィフォルム (*F. naviforme*)、フゾバクテリウム・ペリオドンティカム (*F. periodonticum*)、フゾバクテリウム・ネクロフォーラム (*F. necrophorum*)、フゾバクテリウム・ヴァリウム (*F. varium*)、フゾバクテリウム・ニュークレタム菌 (*Fusobacterium nucleatum*、以下、Fn菌という。)、フゾバクテリウム・ルージー (*F. russii*) 等が知られている。

【0005】

口臭原因菌とも言われているFn菌は、食物残渣や剥離粘膜等に含まれる含硫アミノ酸や含硫アミノ酸を含むペプチド等を分解し揮発性硫化化合物（以下VSCという）を産生するのに対し、Fn菌以外の前記フゾバクテリウム属の菌のVSC産生能はFn菌ほど高くない。また、Fn菌は、歯周病原菌であるポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) やプレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) 等の歯周病原菌と共凝集する特有の性質を有するため、歯周疾患との関連も示唆されている。

【0006】

このように、フゾバクテリウム属の中でFn菌は特に重要な菌種である。しかし、Fn菌は、フゾバクテリウム属の他種と極めて近い類縁関係にあるため、それを分離培養することが困難であり、これまでにFn菌だけを検出することのできる選択培地は開発されていない。

【0007】

また、Fn菌種を検出同定するための試みとして、検体となる微生物の16SリボソーマルDNA（以下16SrDNAという）を抽出し、このDNAと相補関係にある数十の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法による細菌の検出方法が報告されている（非特許文献1）。しかし、前記PCR法ではFn菌のみを検出することはできなかった。

【0008】

【非特許文献1】 Conrads, G. et al, J. Endodontics. 25:433-438. 1997

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0009】**

本発明は、フゾバクテリウム属細菌の中でF n 菌を特異的に区別し、かつ、生体試料に混入されるヒト由来DNAと明確に区別しうる簡便かつ迅速な検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明者らは、F n 菌のrDNAを検討した結果、16SrDNAはフゾバクテリウム属の近縁種間で極めて酷似しており、16SrDNAの中でプライマーを作成しPCR法を行ってもF n 菌の検出・同定は困難であることがわかった。一方、23SリボゾーマルDNA（以下23SrDNAという）はヒトの遺伝子DNAと類似しているため、歯肉縁上歯垢や歯肉縁下歯垢、唾液等の生体試料を分析する点で望ましくない。

そこで、「16SrDNA及び/又はスパーサー部位(配列番号1)の一部を有するフォワードプライマー」と「23SrDNA（配列番号2の相補鎖）の一部を有するリバープライマー」を組み合わせてPCRすることにより初めて、生体試料に混入されるヒト由来DNAと明確に区別し、さらにF n 菌を特異的に区別しうる簡便かつ迅速な検出が可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において、配列番号1に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するフォワードプライマーとは、当該フォワードプライマー自体の全配列又は部分的配列として、配列番号1で表される塩基配列の少なくとも一部に相当する塩基配列であり且つ少なくとも10塩基分の長さを有するプライマーである。

より具体的には、当該フォワードプライマーは、3'末端に配列番号1記載の塩基配列の一部を含むプライマーであり、その5'末端に配列番号1で表される塩基配列とは全く関係ない付加的な塩基配列により延長されていても良い。

当該フォワードプライマーは、配列番号1の相補的塩基配列と後述するPCR法条件下でハイブリダイズし、ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞由来のDNAとハイブリダイズしないものであれば特に限定はないが、プライマーのデザインは以下の条件に適合するものが望ましい。プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが好ましく、より好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、特に好ましくは15塩基以上25塩基以下である。

Tm値は40℃以上、65℃以下になるよう設計するが、より好ましくは50℃以上60℃以下である。GC含量は25%以上、70%以下になるよう設計することが好ましく、より好ましくは40%以上60%以下である。

上記フォワードプライマーとして好ましい配列としては、例えば、GTTTGATCC TGGCTCAG（配列番号11）、CTTAACACATGCAAGTC（配列番号12）、AATGCTTAACACATGCAAGTC（配列番号13）、TCCTACG GGAGGCAGCAGT（配列番号14）、GTC TTGTACACACCGCCC（配列番号15）等を挙げることができる。

【0012】

配列番号2に記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するリバープライマーとは、当該リバープライマー自体の全配列又は部分的配列として、配列番号2で表される塩基配列の少なくとも一部に相当する塩基配列の相補的塩基配列であり且つ少なくとも10塩基分の長さを有するプライマーである。

より具体的には、当該リバープライマーは、3'末端に配列番号2記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部を含むプライマーであり、その5'末端に配列番号2で表される塩基配列の相補的塩基配列とは全く関係ない付加的な塩基配列により延長されていても良い。

当該リバープライマーは、配列番号2のDNAと後述するPCR法の条件下でハイブリダイズし、フゾバクテリウム・ペリオドンティカム（F. periodonticum ATCC 33693）、フゾバクテリウム・ネクロフォーラム（F. necrophorum ATCC 25286

）及びフゾバクテリウム・ヴァリウム (*F. varium* ATCC 8501) の 23S rDNA とハイブリダイズしないものであれば特に限定はないが、プライマーのデザインは以下の条件に適合するものが望ましい。

プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが好ましく、より好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、特に好ましくは15塩基以上25塩基以下である。Tm値は40℃以上、65℃以下になるよう設計するが、より好ましくは50℃以上60℃以下である。GC含量は25%以上、70%以下になるよう設計することが好ましく、より好ましくは40%以上60%以下である。

上記リバースプライマーとして好ましい配列としては、例えばGCCATCACCCAAATGG (配列番号16)、AAGAAAGGGTAACCGACTT (配列番号17) 等を挙げることができる。

【0013】

特に、生体試料からFn菌を特異的に検出する点で下記プライマー (A) と (B)、もしくは (B) と (C) を組み合わせたプライマーセットを用いることが好ましい。

(A) 配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(B) 配列番号3に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(C) 配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第18番目の塩基配列

【0014】

Fn菌由来DNAだけでなく、ヒト由来DNAが含まれている生体試料のPCRを行うため、一般細菌とヒト由来DNAを区別する領域として特に好ましい配列として塩基配列

(A) の1つである配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至39番目の塩基配列を見出した。この塩基配列は、16S rDNAの3'末端の5塩基および、前記5塩基に隣接する16S rDNAと23S rDNAとの間に構成されるスペーサー領域の5'末端の塩基配列からなる部位に存在していた。

【0015】

次にPCR法で増幅するための前記のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し合成した。これらのプライマーを用いて、Fn菌が存在する生体試料についてPCRを行うとき、Fn菌に特異的な増幅産物のみが得られる。

【0016】

Fn菌検出可能な検体としては、歯肉縁上歯垢や歯肉縁下歯垢、舌苔、唾液、歯肉溝滲出液等の口腔関連の生体試料を用いることができる。さらには血液、髄液、化膿部位やその他組織等の生体試料でもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然物由来のものでも使用可能である。

【0017】

好ましいプライマー (A) ~ (C) について説明する。プライマー (A) に該当する、配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマーをフォワードプライマーとして用い、プライマー (B) に該当する配列番号3に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマーをリバースプライマーとしてPCRを行うことができる。プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが使用され、好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、より好ましくは15塩基以上25塩基以下である。塩基配列 (A) としては、例えば18塩基からなる塩基配列 (C) AACGTGCGGATGGATCACや、塩基配列 (A) における塩基番号第1番目乃至22番目の塩基配列 AACGTGCGGATGGATCACCTCCや、塩基番号第7番目乃至26番目の塩基配列 CGGATGGATCACCTCCTTTC、塩基番号第12番目乃至31番目の塩基配列 GGATCACCTCCTTCTAAGG、塩基番号第16番目乃至33番目

の塩基配列 C A C C T C C T T T C T A A G G A G 等を用いることができる。塩基配列 (B) の 1 種 (配列番号 3 に記載の塩基番号第 863 番目乃至 883 番目の塩基配列の相補的塩基配列) および (C) のプライマーを用いて P C R を行った場合、配列番号 3 の塩基配列の増幅産物を特異的に得ることができる。主要な増幅産物の鎖長は、計算上 883 b p であり、塩基泳動像で増幅産物を示す約 900 b p のバンドが確認できる (図 2 参照)。

【0018】

また、試料中の F n 菌数が極めて少ない場合や、より明瞭な電気泳動像を得たい場合には、前記プライマー (A)、(B) とプライマー (D) に該当する、配列番号 3 に記載の塩基番号第 124 番目乃至 156 番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる 10 塩基以上の塩基配列を含むプライマーの 3 つのプライマーを用いてセミネスティット P C R 法を行うことができる。塩基配列 (D) は 16 S r D N A と 23 S r D N A との間のスペーサー領域と呼ばれる部位に存在する。塩基配列 (D) としては 29 塩基からなるものであってもよく、プライマーとしてより好適な 15 ~ 25 塩基、例えば 20 塩基からなる塩基配列を有するプライマー (E) 等を用いることが好ましい。ここで、プライマー (E) とは、配列番号 3 に記載の塩基番号第 124 番目乃至 143 番目の相補的塩基配列を有するプライマーである。

セミネスティット P C R 法は 2 段階の増幅ステップからなる。先ず第 1 の増幅ステップで標的領域を含んだ増幅産物を得る。そして得られた増幅産物を鋳型に第 2 の増幅ステップを行うが、この時最初に使用したプライマー (アウタープライマー) 位置より、どちらか一方のプライマーだけ内側のプライマー (インナープライマー) を使用し、標的領域以外の D N A 由来の増幅産物を除外することができる。第 1 の増幅ステップとして、前記 (A) および (B) の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをアウタープライマーとして P C R を行う。増幅処理を行ったサンプルの一部を用いて第 2 の増幅ステップに入る。第 2 の増幅ステップでは、前記 (A) および (D) の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをインナープライマーとして用い P C R を行う。この場合の主要な増幅産物は、第 2 の増幅ステップで用いたプライマーに依存するため、配列番号 3 に記載の塩基配列の一部に相当する。

【0019】

第 1 の増幅ステップに用いることのできるアウタープライマーとして、前記 (A) の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドの他に、16 S r D N A の塩基配列を基に設計した例えば C G T C A C A C C A C G A G A G T T G G (配列番号 1 に記載の塩基番号第 1384 番目乃至第 1403 番目の塩基配列) 等を用いることもできる。あるいは (B) の塩基配列を含むプライマーの他に 23 S r D N A の塩基配列を基に設計した例えば C C A T T T G G G T G A T G G C (配列番号 2 に記載の塩基番号第 597 番目乃至第 612 番目の塩基配列) の相補的塩基配列をアウタープライマーとして用いることができる。

【0020】

また、セミネスティット P C R 法に代えてネスティット P C R 法も適用が可能である。ネスティット P C R 法は、セミネスティット P C R 法と比較して、両側とも内側のインナープライマーセットを使用する点が異なる。

【0021】

ネスティット P C R 法に使用可能なアウタープライマーとして、前記の (C) や (B) の塩基配列の他に、下記のものを挙げることができる。
フォワードプライマー：配列番号 4 に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列、又は、配列番号 3 に記載の塩基番号第 1 番目乃至第 123 番目の塩基配列の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するプライマー
リバースプライマー：23 S r D N A (配列番号 2 の相補鎖) の一部からなる少なくとも 10 塩基以上の塩基配列を有するプライマー

例えば、アウタープライマーとして、16 S r D N A の塩基配列を基に設計した C G T C A C A C C A C G A G A G T T G G (配列番号 4 に記載の塩基番号第 1384 番目乃至

第1403番目の塩基配列)と、23SrDNAの塩基配列のうち、AAGAAGGGTAACCGACTT(配列番号2に記載の塩基番号第1256番目乃至第1273番目の塩基配列)の相補的塩基配列とを用いて第1ステップの増幅を行うことができる。この場合、Fn菌を特異的に検出するためには、本発明のプライマー(A)と(B)のプライマーセット又はプライマー(B)と(D)のプライマーセットをインナープライマーとして用いることが好ましい。

【0022】

本発明においてPCR法とは、当業者が通常実施する遺伝子増幅方法であるが、以下にその概略を説明する。

鋳型となる2本鎖のDNAを加熱によって、それぞれ、1本鎖DNAに分離(熱変性)させる。その後、アニールによって、標的領域を挟むように、プライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを前記熱変性によって分離された相補関係にあるそれぞれの1本鎖の5'末端にハイブリッド結合させる(アニーリング)。基質である4種類のdNTP(デオキシリボヌクレオチド3リン酸)の存在下、TaqDNAポリメラーゼを作用させると、このプライマーの3'末端に鋳型の塩基配列に従ってヌクレオチドが添加されDNA鎖が伸長する(伸長反応)。この反応を繰り返すことで、標的領域を含むDNA断片を大量に得ることができる。なお、プライマーの合成反応及び鎖長反応の基質としてdNTP中のdTTPの代わりにdUTPを用いても良い。

【0023】

本発明におけるPCR法の温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を90~98℃、プライマー鋳型DNAにハイブリッド結合させるアニーリング反応を37~65℃、TaqDNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を50~75℃で行い、これを1サイクルとし、このようなサイクルを数十サイクル行わせることにより、標的配列を増幅させることが好ましい。PCR後、増幅産物を電気泳動等により分離し、エチジウムブロマイド等で核酸染色を行い、増幅されたポリヌクレオチド配列の鎖長が、上述の標的配列の鎖長と等しければ検体中に検出対象の菌が存在すると判定できる。増幅されたポリヌクレオチド配列の検出には、高速液体クロマトグラフィーも有効である。

【0024】

プライマー鎖長が、本発明において必須の配列部分(例えば、プライマーAにおいては配列番号3の塩基番号第1番目から第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の配列に相当する部分、また、プライマーBにおいては配列番号3に記載の塩基番号第863番目から883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の配列に相当する部分)の5'末端が付加的な配列により延長されている場合には、鎖長追加分が増幅産物に賦与される。逆に、5'末端が短いものを用いたときには、その欠失分だけ増幅産物が短くなる。プライマーは、ビオチン、ジゴキシゲニン、FITC(Fluorecein Isothiocyanate)、アクリジン、ジニトロフェニル、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、 $[^{32}\text{P}]$ dNTPから選ばれる一つ以上を用いて標識されてもよい。

【0025】

本発明に供するサンプルとして、様々な生体試料が考えられるが、例えば唾液、舌苔、歯肉縁上歯垢、歯肉縁下歯垢、口腔内粘膜、歯肉溝滲出液、血液、髄液、化膿性疾患部位の検体、糞便、尿、あるいはそれら生体試料の培養物等を挙げることができる。

【0026】

採取した生体試料は、直接あるいはDNA抽出後PCRに供することができる。DNA抽出は、常法に従って行うことができる。例えば、アルカリ抽出もしくは界面活性剤抽出、酵素処理、ボーリング法等のうちいずれか一つ以上の方法、もしくは市販のキットを用いてDNA抽出を行う。

【0027】

生体から抽出されたDNAを含む試料は、常法に従って更に精製処理をしてもよい。例えば高速液体クロマトグラフィーもしくはアルコール沈殿、塩析、シリカゲルカラム、シ

リカゲルメンブレン等のうちいずれか一つ以上の方法、もしくは市販のキットを用いて、DNA精製する。

【0028】

前記のプライマーや増幅産物は、Fn菌検出のためのプローブとしても有用である。増幅産物は制限酵素等を用いて、適当な長さのDNA断片にしてもよい。制限酵素としてEcoRI、MseI、BanII、AluI、MboI、FokI、TaqI、MboII、HinfI、AvaIIから一つ以上を用いることができる。制限酵素処理して得られたDNA断片は、電気泳動や高速液体クロマトグラフィー、シリカゲルカラム、シリカゲルメンブレン、ナイロンメンブレン等を用いて精製することが望ましい。

【0029】

これらのプローブは標識物質で標識することも可能である。標識物質としてビオチン、ジゴキシゲニン、FITC (Fluorecein Isothiocyanate)、アクリジン、ジニトロフェニル、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、 $[^{32}\text{P}]$ dNTPから選ばれる一つ以上を用いてプローブを標識することが可能である。

【0030】

これらプローブは支持担体に結合させ、DNAチップとして用いることができる。DNAチップの作製等については、常法に従って実施することができる。例えば、プローブをチップ基板上に配置させるプローブ配置型や、ガラスやシリコンなどの基板上で直接DNAの伸長反応を用いてプローブDNAを生成させたプローブ合成型などを用いてもよい。また、市販のDNAチップ作製装置及びその読み取りには、DNAチップ読み取り装置等を用いてもよい。

【0031】

菌検出又は同定用キットは、本発明のプローブおよび／またはプライマーを含む。さらに他の成分としてTaq DNAポリメラーゼ、その他の酵素、dNTP等の基質、緩衝液等を含む。

【実施例】

【0032】

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

<実施例1>Fn菌の検出1

下記プライマーを用いて、フゾバクテリウム・ニュークレタム標準菌の検出を行った。

フォワードプライマー: 5' -AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースプライマー: 5' -CTACGCCAAACGACTAATTTCG-3'

3種類のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌標準株 (Fusobacterium nucleatum ATCC 25586、ATCC 10953、ATCC 23726) を、変法FM培地 (日水製薬株式会社製) 上にて3~5日間37℃で嫌気培養を行い、出現したコロニーを1白金耳分採取し市販キット (キアゲン社製DNAミニキット) を用いてDNA抽出液を得た。DNA抽出液1μlに50mMのMgCl₂溶液を1.5μl、各2mMのdNTP溶液 (アプライドバイオシステム社製) 2μl、12.5pmol/μlのフォワードプライマー溶液1μl、12.5pmol/μlのリバースプライマー溶液1μl、5U/μlのTaq DNAポリメラーゼ溶液 (アプライドバイオシステム社製) 0.5μl、Ampli Taq Gold緩衝液 (アプライドバイオシステム社製) 5μlをそれぞれ加え、更に滅菌した超純水を全量50μlになるよう加えて反応液とした。

【0033】

PCRの反応条件は、以下の通りである。

熱変性: 94℃、30秒

アニーリング: 55℃、30秒

伸長反応: 72℃、30秒

反応サイクル: 40回

【0034】

これらの操作は、アプライド・バイオシステム社製のGeneAmp 9700システムを用いて行った。増幅産物の有無は、常法のアガロース電気泳動法に従った。電気泳動のためのアガロースゲルを用意し予めTAE (Tris-acetate, Ethylenediamine-Tetraacetic Acid) バッファーを満たした泳動装置にセットし、PCR反応物を試料溝にセットした。100V、15分間泳動した後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液に30分浸漬し、核酸を染色した。染色後、UVトランスイルミネーターを用いて、増幅産物のバンドを確認した。電気泳動の結果は図2の通りである。図中のレーン1はマーカー、レーン2はATCC 25586株、レーン3はATCC 10953株、レーン4はATCC 23726株の電気泳動像を示す。3菌種のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌全てに約900bpの増幅産物を示すバンドが認められた。

【0035】

<実施例2>Fn菌の検出

下記プライマーを用いて、実施例1同様の試験を行った。

フォワードプライマー: 5' —GGATTAGATACCCCTGGTAGTC—3'

リバースプライマー: 5' —GCCATCACCCCAAATGG—3'

フゾバクテリウム・ニュークレタム菌(ATCC 25586株)において約1500bpの増幅産物を示すバンドが認められた。

【0036】

<比較例1>Fn菌以外のフゾバクテリウム属細菌およびヒト由来細胞のPCR

供試菌体および供試細胞はとして、Fn菌以外の5菌種、すなわちフゾバクテリウム・ナヴィフォルム(F. naviforme ATCC 25832)、フゾバクテリウム・ペリオドンティカム(F. periodonticum ATCC 33693)、フゾバクテリウム・ネクロフォーラム(F. necrophorum ATCC 25286)、フゾバクテリウム・ヴァリウム(F. varium ATCC 8501)及び、フゾバクテリウム・ルージー(F. russii ATCC 25533)と、ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞(Normal Gingiva Fibroblast ATCC CRL 1292)を供試した。

【0037】

ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞は、改良イーグルス培地(Dulbecco社製)に10%のウシ胎児血清を加えた培地中で、5%CO₂の気相条件で、37℃、72時間培養後回収し、生理食塩水で洗浄後DNA抽出を行った。それ以外の菌株については、実施例1同様の操作を行った。電気泳動の結果は図3の通りである。レーン1はマーカー、レーン2はフゾバクテリウム・ナヴィフォルム、レーン3はフゾバクテリウム・ペリオドンティカム、レーン4はフゾバクテリウム・ネクロフォーラム、レーン5はフゾバクテリウム・ヴァリウム、レーン6はフゾバクテリウム・ルージー、レーン7はヒト由来正常歯肉繊維芽細胞の電気泳動像を示す。いずれのレーンにも増幅産物を示すバンドは認められなかった。

【0038】

<実施例3>生体試料のPCRの実施

1. 試料の調製

被験者5名から生体試料として、唾液、舌苔、歯肉縁下歯垢および口腔粘膜を採取した。それぞれの採取方法は下記の通りである。

(1) 唾液の場合

1mlの唾液を採取し、5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て、PBS(phosphate buffered saline: 磷酸緩衝生理食塩水)1mlを加え、再懸濁した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

(2) 舌苔の場合

舌ブラシで舌を擦過し、舌苔を採取した。得られた舌苔中10mgを分取し、これに1mlのPBSを加えて懸濁後5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

【0039】

(3) 歯肉縁下歯垢の場合

歯周ポケット部位に対しペーパーポイント (United Dental Manufacturers Inc. 製) 2本を差込み、歯肉縁下歯垢を採取した。このペーパーポイントを1mlのPBS中で強く1分間攪拌ボルテックスし、付着物を回収した。ペーパーポイントを取り除いた後、懸濁液を5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

(4) 口腔粘膜の場合

シードスワブを用いて、頬粘膜を採取した。採取物を1mlのPBSにて懸濁した。懸濁液を5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

【0040】

それ以外は、実施例1同様の操作を行った。電気泳動の結果は図4(1)～(4)の通りである。図4(1)は唾液からの検出結果、図4(2)は舌苔からの検出結果、図4(3)は歯肉縁下歯垢からの検出結果、図4(4)は口腔粘膜からの検出結果を示す。各図のレーン1はマーカー、レーン2は被験者A、レーン3は被験者B、レーン4は被験者C、レーン5は被験者D、レーン6は被験者Eからの採取試料の電気泳動像を示す。唾液に関しては、5名中3名に、舌苔に関しては、5名中4名に、歯肉縁下歯垢に関しては5名全員に、口腔粘膜に関しては5名中1名に約900bpのバンドが認められた。

【0041】

<実施例4>生体試料の定量PCRの実施

実施例3の歯肉縁下歯垢試料を用いて、定量PCRを行った。核酸定量試薬としてSYBR Green (Molecular Probe社製) を3000倍希釈したものを5 μ l供試した。下記のプライマーを12.5pMの濃度になるように滅菌した超純水で希釈したものを1 μ l用いた。それ以外の試薬は実施例1の反応液組成の通りである。これらを混ぜ合わせて反応液を調製し、アプライドバイオシステム社製ABI プリズム7000システムを用いて定量PCRを行った。結果を表1に示した。

フォワードプライマー: 5' -AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースプライマー: 5' -TCTAAAGAAATTGTTTAGAG-3'

【0042】

【表1】

表1

被験者	細菌数 (copies/採取部位)
A	1.9E+04
B	5.8E+06
C	2.5E+04
D	3.1E+02
E	8.0E+01

【0043】

<実施例5>生体試料のセミネスティットPCRの実施

下記のプライマーを用いて、2段階のPCRから成るセミネスティットPCRを行った。
第1ステップのPCRに供試したプライマー:

フォワードプライマー：5'—AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー：5'—CTACGCCAAACGACTAATTTCG—3'

第2ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'—AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー：5'—TCTAAAGAAATTGTTTAGAG—3'

【0044】

生体試料として実施例3の唾液を用いた。第1ステップおよび第2ステップのPCRとも40サイクルの増幅を行った。それ以外は実施例1と同様の操作を行った。電気泳動の結果を図5に示した。図中のレーン1はマーカ、レーン2は被験者A、レーン3は被験者B、レーン4は被験者C、レーン5は被験者D、レーン6は被験者Eからの採取試料の電気泳動像を示す。5名中3名に増幅産物を示すバンドが検出された。

【0045】

＜実施例6＞生体試料のネスティブPCRの実施

下記のプライマーを用いて、2段階のPCRから成るセミネスティブPCRを行った。

第1ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'—CGTCACACCACGAGAGTTGG—3'

リバースプライマー：5'—CTACGCCAAACGACTAATTTCG—3'

第2ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'—AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー：5'—TCTAAAGAAATTGTTTAGAG—3'

結果は実施例5と同様であった。

【0046】

＜実施例7＞Fn菌に特異的なプローブを用いたDNAチップ

実施例1において得られたプローブを常法により蛍光標識し、ガラス板に吸着させた。これを実施例3の唾液試料から得られたDNAと反応させた。結果を表2に示した。

【0047】

【表2】

表2

被験者	Fn菌の検出
A	検出
B	検出
C	検出
D	検出せず
E	検出せず

【0048】

＜実施例8＞Fn菌に特異的なプローブを用いた検出キット

実施例1において得られたプローブを常法により蛍光標識し、ガラスビーズに吸着させた。これを実施例3の唾液試料から得られたDNAと反応後、常法に従って発色させた。結果を表3に示した。

【0049】

【表 3】

表 3

被験者	F n 菌の検出
A	検出
B	検出
C	検出
D	検出せず
E	検出せず

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図 1】 rRNA をコードする DNA の構成を示す図である。

【図 2】 実施例 1 におけるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の PCR 増幅産物の電気泳動像である。

【図 3】 フゾバクテリウム・ニュークレタム菌以外のフゾバクテリウム属細菌とヒト由来細胞における増幅産物の電気泳動像である。

【図 4】 生体試料における PCR の結果である。(1) 唾液、(2) 舌苔、(3) 歯肉縁下歯垢、(4) 口腔粘膜

【図 5】 生体試料におけるセミネスティット PCR の結果である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kao Corporation

<120> Primers For Detecting Fusobacterium Nucleatum By PCR Methods And Methods For Detection

<130> 030847

<150> JP 2002-358698

<151> 2002-12-10

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1661

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1650)..(1650)

<223> n stands for any base

<400> 1

attgaacgaa gagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg acagaatgct taacacatgc 60

aagtctactt gaatttgggt tttttaactt cgatttgggt ggcggacggg tgagtaacgc 120

gtaaagaact tgcctcacag ctagggacaa catttggaac cgaatgctaa tacctgatat 180

tatgattata gggcatccta gaattatgaa agctatatgc gctgtgagag agctttgcgt 240

cccattagct agttggagag gtaacggctc accaaggcga tgatgggtag ccggcctgag 300

agggtgaacg gccacaagg gactgagaca cggcccttac tcctacggga ggcagcagtg 360

gggaatattg gacaatggac cgagagtctg atccagcaat tctgtgtgca cgatgacgtt 420

tttcggaatg taaagtgctt tcagttggga agaaaaaat gacggtacca acagaagaag 480

tgacggctaa atacgtgcca gcagccgcgg taatacgtat gtcacgagcg ttatccggat 540

ttattgggcg taaagcgcgt ctaggtgggt atgtaagtct gatgtgaaaa tgcagggctc 600

aactctgtat tgcgttgga actgtgtaac tagagtactg gagaggtgag cggaactaca 660

agtgtagagg tgaaattcgt agatatttgt aggaatgccg atggggaagc cagcttactg 720
 gacagatact gacgctgaag cgcgaaagcg tgggtagcaa acaggattag ataccctggt 780
 agtccacgcc gtaaacgatg attactaggt gttgggggtc gaacctcagc gccaagcaa 840
 acgcgataag taatccgcct ggggagtagc tacgcaagta tgaaactcaa aggaattgac 900
 ggggacccgc acaagcgggtg gagcatgttg ttttaattcga cgcaacgcga ggaaccttac 960
 cagcgtttga catcttagga atgagacaga gatgtttcag tgtcccttcg gggaaacctt 1020
 aagacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc 1080
 aacgagcgca acccctttcg tatgttacca tcattaagtt ggggactcat gcgatactgc 1140
 ctacgatgag taggaggaag gtggggatga cgtcaagtca tcatgcccct tatacgctgg 1200
 gctacacacg tgctacaatg ggtagaacag agagttgcaa agccgtgagg tggagctaat 1260
 ctcagaaaac tattcttagt tcggattgta ctctgcaact cgagtacatg aagttggaat 1320
 cgctagtaat cgcgatcag caatgtcgcg gtgaatacgt tctcgggtct tgtacacacc 1380
 gcccgtcaca ccacgagagt tggttgcacc tgaagtagca ggcctaaccg taaggaggga 1440
 tgttccgagg gtgtgattag cgattgggggt gaagtcgtaa caaggtatcc gtacgggaac 1500
 gtgcggatgg atcacctcct ttctaaggag aatgtgtctt tctctattct atttggaatg 1560
 ttcttacatt acttctgaac attggaaact atatagtaga acaacaaga aaaaaattaa 1620
 ctctaaacaa tttctttaga gttagcttgn caaaaaata g 1661

<210> 2

<211> 2927

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 2

gttaaaataa ttaagggcac acaaaggatg cctaggtagt aagagccgat gaaggacgtg 60
 gtaagctgcg ataagcctag ataagttgca atcgaacgta agagtctagg atttccgaat 120
 ggagcaatct attaagatgg agtccttaata cgaaagaggg aaccgcgtga actgaaacat 180
 ctaagtaacg cgaggaaaag aaagtaaaaa cgatacccaa agtagcggcg agcgaactgg 240

gtcaagccta aaccttaaat atgtcaagga tacagccgtt gtatttaagg ggtagaggga 300
caaagtagtg aagaactgta agatattcaa tatagtgtat tgatgaatta gaattgtctg 360
gaaagatgaa ccgcagaagg tgaaagtcct gtataagtaa atccttacac atataacttt 420
gctcccaagt aacatggaac acgaggaatt ctgtgtgaat cagtgaggac caaatctcat 480
aaggctaaat actcttacta accgatagcg catagtaccg tgaggggaaag gtgaaaagaa 540
cccctggagg ggagtgaat agaacctgaa attgtgtgct tacaagcggc cagagcccat 600
ttgggtgatg gcgtgccttt tggagaatga tcctgcgagt tacgttaaac ggcgagggtta 660
agtataacgg agccgaaggg aaaccaagtc ttaatagggc gaattagtcg tttggcgtag 720
acgcgaaacc tggatgacta aacctgtcca ggatgaagct gtggtgaagac acagtggagg 780
tcctaaccce ccgccgttga aaagttgggg gatgaggtag gtttaggggt gaaaagccaa 840
tcgaaccagg agatagctcg ttctctccga aatgcatcta ggtgcagcct tgagtgttca 900
attatggggg tagagcactg aatgatctag ggggcatatt gcttactgaa atcaatcaaa 960
ctccgaatac cataatttat agctcaggag tgagactatg ggagttaact tccattgtca 1020
aaagggaac aaccagacc accagctaag gtcctaatt ataactaagt gggaaaggag 1080
gtggagattc acaacaact aggaggttgg cttagaagca gccatacctt taaagagtgc 1140
gtaatagctc actagtcgag agtctctgcg ccgacaatgt aacggggcta agttataaac 1200
cgaagctgtg gaatcctttt ggattggtag gagagcgttc tgtaggccgt tgaagaagaa 1260
gggtaaccga ctttggagggt atcagaagtg agaatgcagg aataagtagc gagaaagggg 1320
gcgagaatcc tcctcgccgg aagaccaagg ttttcagggt aaagcttgct ttccttgagt 1380
aagccgggac ctaagcccag gctataatgc gtaggcgaat ggaaaacaga ttaatatctc 1440
tgtgccagtc atgtattgtg atggaggggc gcagaagggg atgcgcgcgg acgaacggaa 1500
gtgtccgtag aagtatgtag ggtgacttag taggtaaatc cattaagtta aatctgaggt 1560
atgatataca gtcgtaagat gaatgcgcaa atcccacgct gccaaagaaa gcttctaacg 1620
ttaatatatg actgcccgtg ctgtaaaccg acacaggtgg tcaggatgag aaatctaagg 1680
cggacaggct aactctcggt aaggaactct gcaaaataac ctcgtaactt cgggagaaga 1740

ggagcccttg tgtgtgagta tacacgcgat acaaagcgca cgagggtcgc agtgaagagg 1800
ctcaagcaac tgtttaacaa aaacacaggt ctatgctaag ctgtaaggcg atgtatatgg 1860
gctgacacct gccagtgct ggaaggttaa gaggaggagt gagagctccg aattgaagcc 1920
ccagtgaacg gcggccgtaa ctataacggt cctaaggtag cgaaattcct tgtcgggtaa 1980
gttccgacct gcacgaatgg tgtaatgatt tgagcgctgt cttgacggga ggcctgggtga 2040
aattgtatta ccggtgaaga taccggttac ctacagtagg acggaaagac cccatggagc 2100
tttactgtag cttgggtattg ggTTTTGGCA ttgcatgtat aggatagttg ggagactatg 2160
atgatatggc gctagctgta tcggagtcac cggtggaata ccaaccattc aatgctgaaa 2220
ttctaactcg tggttttag ccacggagac agtgctaggt gggcagtttg actggggcgg 2280
tcgcctccga aagagtaacg gaggcgttca aaggttctct caggttggat ggaaatcaac 2340
catagagtgc aatggcataa gagagcttga ctgcaagact gacgggtcga gcagatgcga 2400
aagcaggaca tagtgatccg gcgattccga atggaagggt cgtcgctcaa cggataaaag 2460
ctaccctggg gataacaggc tgatcctacc cgagagtcca tatcgacggg agggtttggc 2520
acctgatgt cggctcatcg catcctgggg ctggagaagg tccaagggt tgggctgttc 2580
gccattaaa gcggtacgtg agctgggttc agaacgtcgt gagacagttc ggtccctatc 2640
cactgtaggc gttagaatat tgagaagacc tgccttagt acgagaggac cgggatggac 2700
aaacctctga tgtaccagtt gtcacgccag tggcacagct gggtagtcac gtttgaata 2760
gataaccgct gaaagcatct aagcgggaaa ctaacttcaa gataagtatt cttaagata 2820
ccttcgagcc taggaggttg ataggttggg ggtgtaagta cagcaatgta tttagctgac 2880
caataactaat tatcgaagtt ttaatcta atctactata tagtttc 2927

<210> 3
<211> 883
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)..(153)
<223> n stands for any base

<400> 3

aacgtgcgga tggatcacct cctttctaag gagaatgtgt ctttctctat tctattggta 60
atgttcttac attacttctg aacattggaa actatatagt agaacaaca agaaaaaat 120
taactctaaa caatttcttt agagttagct tgncaaaaaa taggttaaaa taattaaggg 180
cacacaaagg atgcctaggt agtaagagcc gatgaaggac gtggtaagct gcgataagcc 240
tagataagtt gcaatcgaac gtaagagtct aggatttccg aatggagcaa tctattaaga 300
tggagtctta atacgaaaga gggaaccgcg tgaactgaaa catctaagta acgcgaggaa 360
aagaaagtaa aaacgatacc caaagtagcg gcgagcgaac tgggtcaagc ctaaacctta 420
aatatgtcaa ggatacagcc gttgtattta aggggtagag ggacaaagta gtgaagaact 480
gtaagatatt caatatagtg tattgatgaa ttagaattgt ctggaaagat gaaccgcaga 540
aggtgaaagt cctgtataag taaatcctta cacatataac tttgctccca agtaacatgg 600
aacacgagga attctgtgtg aatcagttag gaccaaactc cataaggcta aatactctta 660
ctaaccgata gcgcatagta ccgtgaggga aaggtgaaaa gaaccctgg aggggagtga 720
aatagaacct gaaatttgtg gcttacaagc ggtcagagcc catttgggtg atggcgtgcc 780
ttttggagaa tgatcctgcg agttacgtta aacggcgagg ttaagtataa cggagccgaa 840
gggaaaccaa gtcttaatag ggcgaattag tcgtttggcg tag 883

<210> 4

<211> 1502

<212> DNA

<213> *Fusobacterium nucleatum*

<400> 4

attgaacgaa gagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg acagaatgct taacacatgc 60
aagtctactt gaatttgggt tttttaactt cgatttgggt ggcgacggg tgagtaacgc 120
gtaaagaact tgcctcacag ctagggacaa catttggaaa cgaatgctaa tacctgatat 180
tatgattata gggcatccta gaattatgaa agctatatgc gctgtgagag agctttgcgt 240
cccattagct agttggagag gtaacggctc accaaggcga tgatgggtag ccggcctgag 300

agggtgaacg gccacaaggg gactgagaca cggcccttac tcctacggga ggcagcagtg 360
gggaatattg gacaatggac cgagagtctg atccagcaat tctgtgtgca cgatgacgtt 420
tttcggaatg taaagtgctt tcagttggga agaaaaaat gacggtacca acagaagaag 480
tgacggctaa atacgtgcca gcagccgcgg taatacgtat gtcacgagcg ttatccggat 540
ttattgggcg taaagcgcgt ctaggtggtt atgtaagtct gatgtgaaaa tgcagggctc 600
aactctgtat tgcgttggaa actgtgtaac tagagtactg gagaggttaag cggaactaca 660
agtgtagagg tgaaattcgt agatatttgt aggaatgccg atggggaagc cagcttactg 720
gacagatact gacgctgaag cgcgaaagcg tgggtagcaa acaggattag ataccctggg 780
agtccacgcc gtaaacgatg attactaggt gttgggggtc gaacctcagc gccaagcaa 840
acgcgataag taatccgcct ggggagtagc tacgcaagta tgaaactcaa aggaattgac 900
ggggacccgc acaagcgggtg gagcatgtgg tttaattcga cgcaacgcga ggaaccttac 960
cagcgtttga catcttagga atgagacaga gatgtttcag tgtcccttcg gggaaaccta 1020
aagacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgcg 1080
aacgagcgca acccctttcg tatgttacca tcattaagtt ggggactcat gcgatactgc 1140
ctacgatgag taggaggaag gtggggatga cgtcaagtca tcatgccctt tatacgctgg 1200
gctacacacg tgctacaatg ggtagaacag agagttgcaa agccgtgagg tggagctaat 1260
ctcagaaaac tattcttagt tcggattgta ctctgcaact cgagtacatg aagttggaat 1320
cgctagtaat cgcgaatcag caatgtcgcg gtgaatacgt tctcgggtct tgtacacacc 1380
gcccgtcaca ccacgagagt tggttgcacc tgaagtagca ggcctaaccg taaggaggga 1440
tgttccgagg gtgtgattag cgattggggg gaagtcgtaa caaggtatcc gtacgggaac 1500
gt 1502

<210> 5

<211> 152

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 5

aacgtgcgga tggatcacct cctttctaag gagaatgtgt ctttctctat tctattggta 60

atgttcttac attacttctg aacattggaa actatatagt agaacaaca agaaaaaat 120

taactctaaa caatttcttt agagttagct tg 152

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 6

aacgtgcgga tggatcac 18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 7

ctacgcaaaa cgactaatc g 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 8

ggattagata ccctggtagt c 21

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 9

gccatcacc aaatgg 16

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 10

tctaaagaaa ttgttttagag 20

<210> 11
<211> 17
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 11
gtttgatcct ggctcag 17

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 12
cttaacacat gcaagtc 17

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 13
aatgcttaac acatgcaagt c 21

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 14
tcctacggga ggcagcagt 19

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 15
gtcttgtaca caccgccc 18

<210> 16
<211> 16
<212> DNA
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 16

gccatcaccc aaatgg

16

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

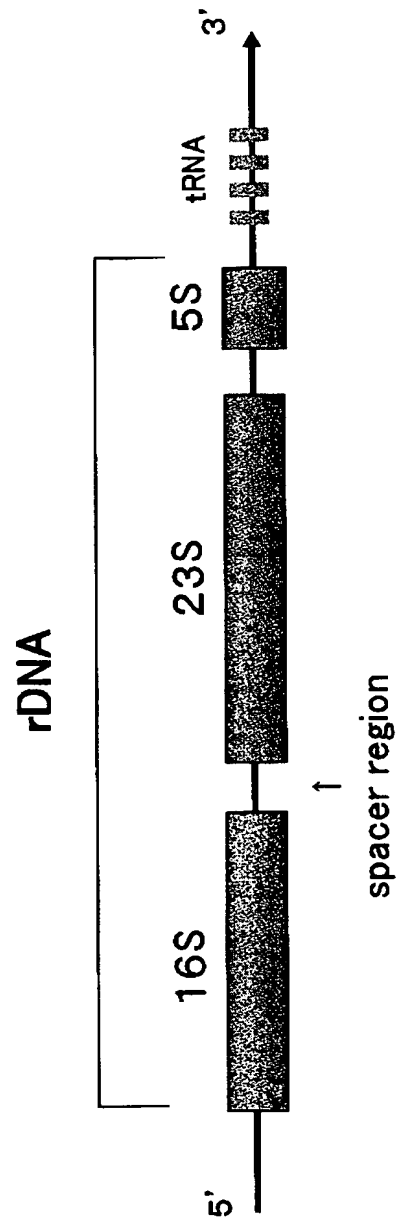
<213> Fusobacterium nucleatum

<400> 17

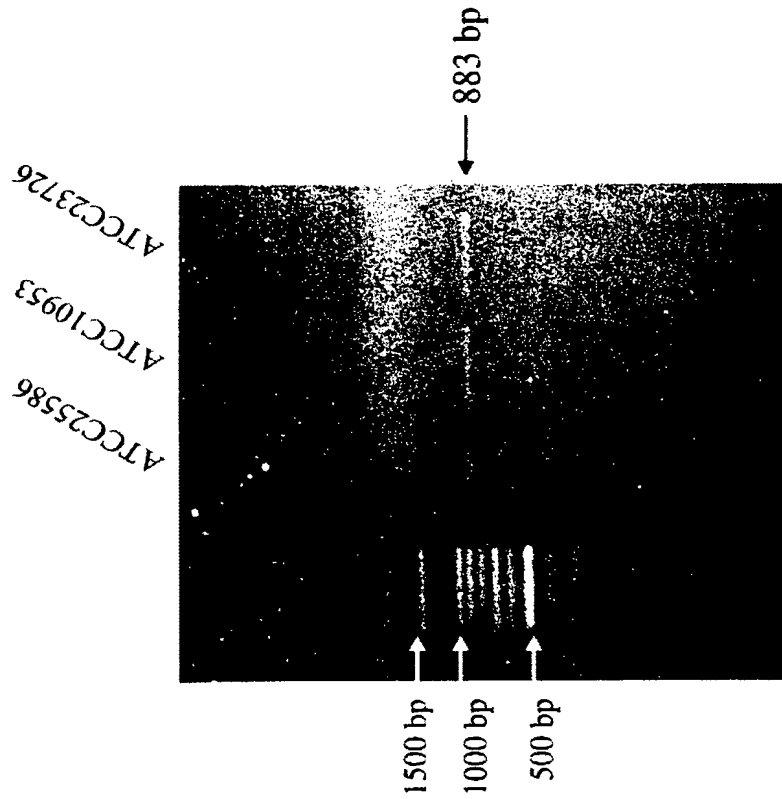
aagaaggta accgactt

18

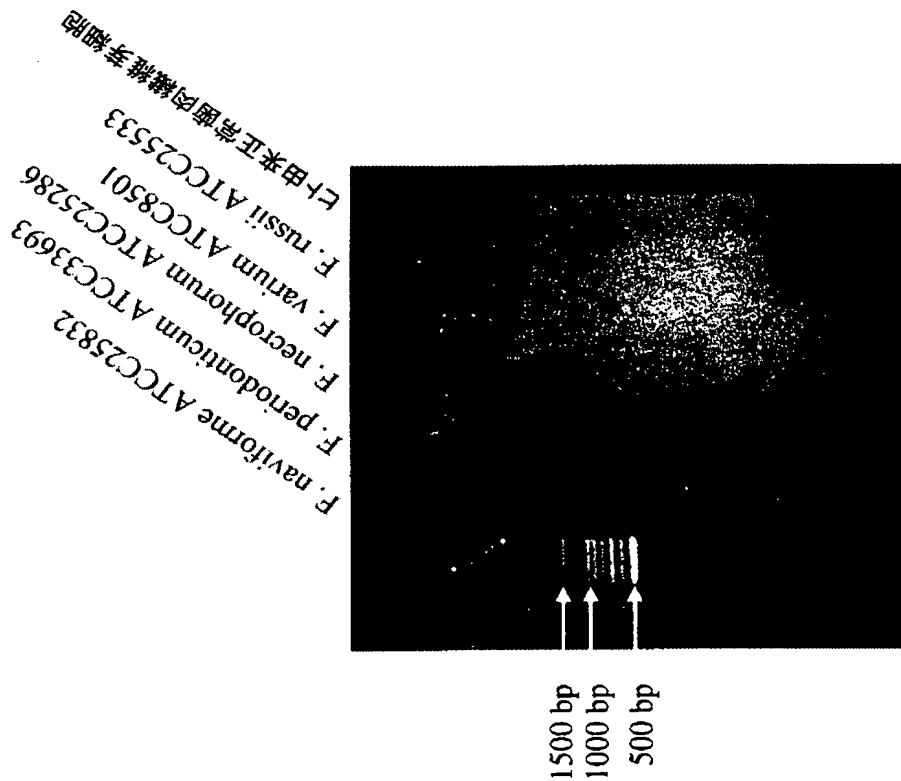
【書類名】 図面
【図 1】



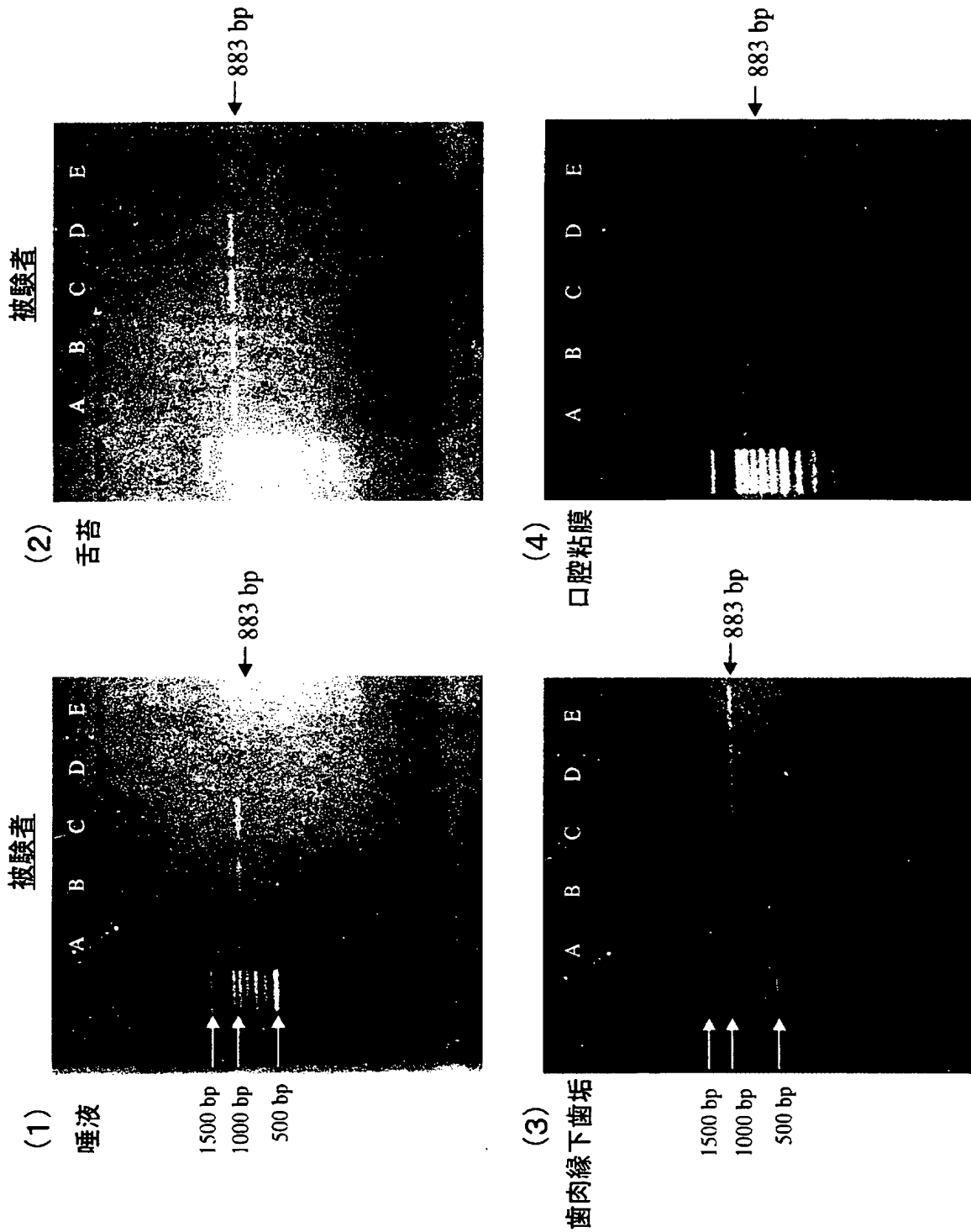
【図 2】



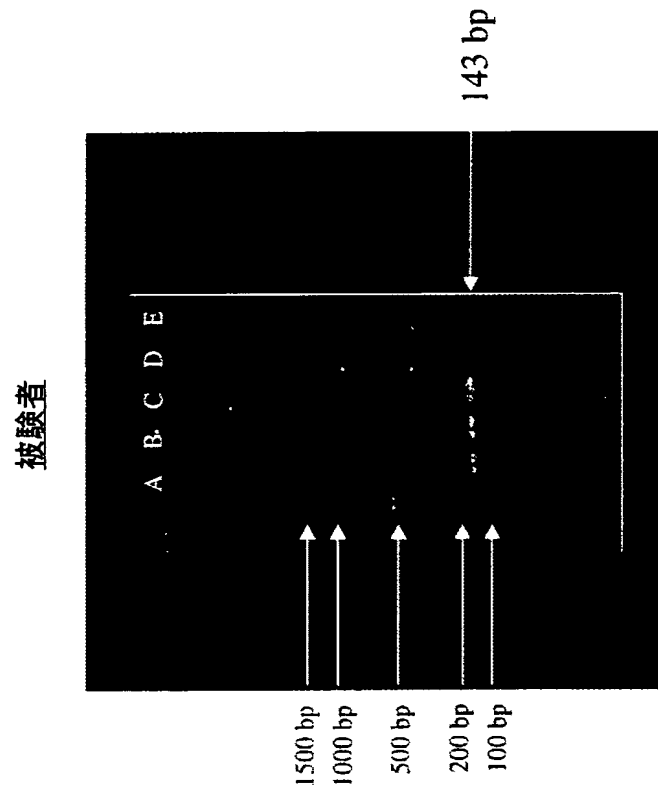
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 本発明は、生体試料中から化膿性疾患関連細菌及び口臭原因菌であるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌を特異的に検出する方法を提供する。

【解決手段】 下記（１）及び（２）のプライマーを含む、ＰＣＲ法による細菌の検定及び/又は定量用の方法。

（１）配列番号１に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも１０塩基以上の塩基配列を有するフォワードプライマー

（２）配列番号２に記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部からなる少なくとも１０塩基以上の塩基配列を有するリバースプライマー

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 0 3 7 1 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名

花王株式会社